

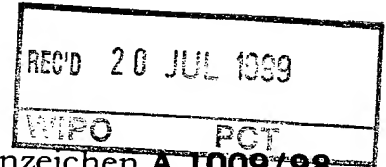
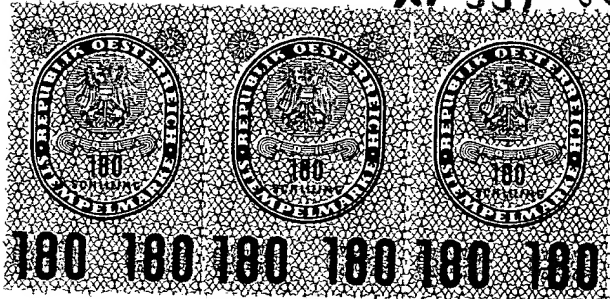


PCT/AT 99/00150  
09/719404

# ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

A-1014 WIEN, KOHLMARKT 8 – 10

AT 99/150



Aktenzeichen A 1009/98

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

**Dr. Franz GABOR**  
in A-3385 Gerersdorf, Am Schmiedberg 7  
(Niederösterreich) und  
**Dr. Michael WIRTH**  
in A-1160 Wien, Hubergasse 11,

am **10. Juni 1998** eine Patentanmeldung betreffend

**"Pharmazeutisches Präparat",**

überreicht haben und dass die beigeheftete Beschreibung samt Zeichnungen mit der ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten Beschreibung samt Zeichnungen übereinstimmt.

**PRIORITY  
DOCUMENT**

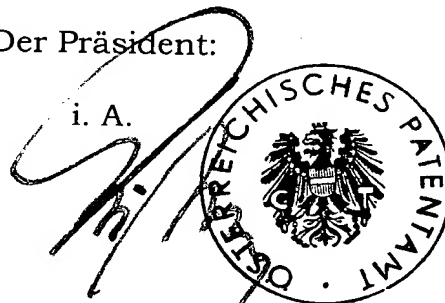
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Österreichisches Patentamt

Wien, am 23. Juni 1999

Der Präsident:

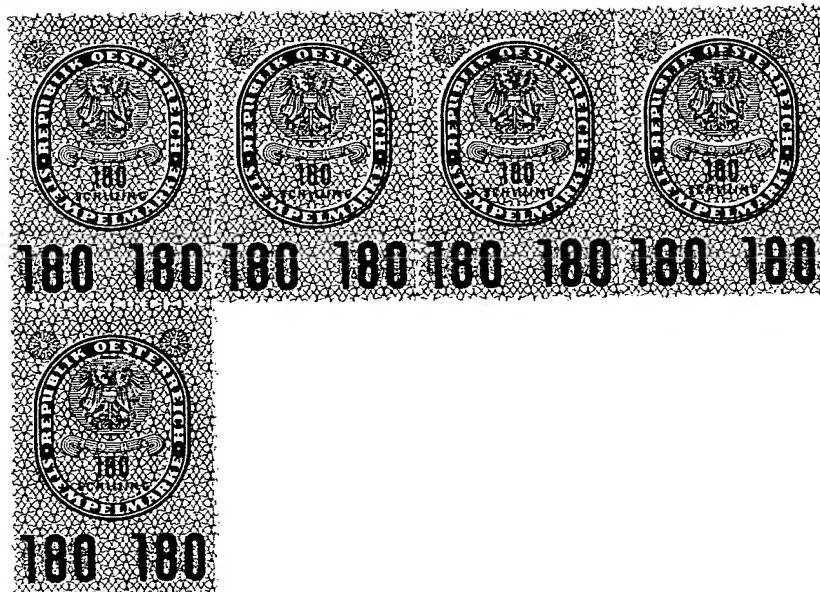
i. A.



**Kanzleirat FUHRLINGER**  
Fachoberinspektor



100000



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Verwaltungsstellen-Direktion

.....540..... S ..... €

Kanzleigegebühr bezahlt.

*Balham*

A1009/98-1

R 34335

(51) Int. Cl. : **Urtext**

AT PATENTSCHRIFT

(11) Nr.

(73) Patentinhaber: Dr. Franz GABOR  
A-3385 Gerersdorf

(54) Gegenstand : Dr. Michael WIRTH  
A-1160 wien  
Pharmazeutisches Präparat

(61) Zusatz zu Patent Nr.

(67) Umwandlung aus GM

(62) Ausscheidung aus :

(22) (21) Angemeldet am: 10. Juni 1998

(33) (32) (31) Unionspriorität :

(42) Beginn der Patentdauer:

Längste mögliche Dauer:

(45) Ausgegeben am :

(72) Erfinder :

(60) Abhängigkeit:

(56) Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht gezogen wurden:

1

Die Erfindung betrifft pharmazeutische Präparationen umfassend Lektine und pharmazeutische Wirkstoffe.

Das Konzept des "Drug Targeting" ist durch die Tatsache begründet, daß viele Arzneimittel in bezug auf deren Aufnahme- oder Wirkungsloci in den Zellen nicht selektiv sind. Besonders auf dem Gebiet der Chemotherapie bei Krebserkrankungen führt die Wirkung der eingesetzten Arzneimittelsubstanzen in Nicht-Zielzellen zu schweren unerwünschten Nebenwirkungen, die eine erfolgreiche Therapie gefährden können (1). Die Verwirklichung der gezielten Zuführung von Arzneimittelsubstanzen zu den spezifischen Zielzellen wurde bislang durch große Schwierigkeiten bei der Auffindung geeigneter Carrier-Moleküle, die in eine spezifische Wechselwirkung mit der betroffenen (Ziel-)Zelle treten können, gehindert. Mit dem Fortschritt in der Biotechnologie wurden monoklonale Antikörper (2) und rekombinante Proteine (3), welche spezifisch an bestimmte Loci binden können, als vielversprechende Kandidaten für aktive und zielgerichtete Arzneimittelzufuhr etabliert. Weiters wurden auch kolloidale Partikel, wie Albumin- oder Polystyrol-Mikrokügelchen, für passiven Arzneimittel-Transport in bestimmte Kompartimente verwendet (4,5).

Lektine, die eine wichtige Rolle bei der biologischen Signalübermittlung, bei Zell/Zell- und Zell/Matrix-Wechselwirkungen spielen, sind eine weitere Gruppe von Molekülen, von denen man annimmt, daß sie zur zielgerichteten Arzneimittel-Verabreichung verwendet werden können. Es ist bekannt, daß Lektine, die ursprünglich als Proteine in Pflanzenextrakten identifiziert worden waren, in der Lage sind, an bestimmte Oligosaccharid-Gruppen zu binden (6). Es wurde vorgeschlagen, unter Ausnutzung dieser Kohlehydrat-spezifischen Wechselwirkung Lektine in einem zielgerichteten "Drug Delivery" -System einzusetzen (7), da das Glykosylierungsmuster von Zellen nach maligner Transformation verändert ist (8).

Weizenkeim-Agglutinin (wheat germ agglutinin; WGA) ist ein dimeres, Kohlehydrat-freies Protein, welches aus zwei identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 35 kDa besteht. Jede monomere Untereinheit enthält zwei identische und unabhängige Bindungsstellen für N-Acetyl-D-glukosamin (9). Nachdem Weizenkeime, die rund 300mg WGA pro kg enthalten (10), zur normalen Ernährung des Menschen gehören, ist die perorale

Toxizität zu vernachlässigen. WGA bindet spezifisch an N-Acetyl-D-glukosamin-hältige Strukturen. Es wurde durch Sättigungsanalysen mit Fluoreszenz-markiertem Lektin gefunden, daß die WGA-Bindungskapazität von Colonkarzinom-Zellen (Caco-2-Zellen) rund 13mal höher ist als die von menschlichen Colonozyten (11).

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine pharmazeutische Präparation zur Verfügung zu stellen, mit welcher die Vorteile des Lektin-Systems bei der Zielzellenerkennung für die zielgerichtete Zufuhr von Arzneimitteln an spezifische Zielzellen ausgenützt werden kann, ohne daß es dabei zu wesentlichen Nebenwirkungen, insbesondere zu toxischen Nebenwirkungen oder Nebenwirkungen, die durch Wirkung auf Nicht-Zielzellen hervorgerufen werden, kommt. Insbesondere soll dieses System bei der Behandlung von Krebserkrankung wirksam eingesetzt werden können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein pharmazeutisches Präparat, welches ein Lektin, an das ein Arzneimittel verabreichungsstabil gebunden ist, umfaßt.

Als Lektin wird bevorzugterweise ein Lektin verwendet, das pflanzlichen Ursprungs ist, wobei vor allem solche Pflanzenlektine verwendet werden können, die als gewohnte Nahrungsmittelquellen des Menschen bekannt sind, wie z.B. auch Weizen, Soja, Reis, Bohnen, Gerste, Roggen, usw.. Die Spezifität von Lektinen ist für die meisten bekannten Lektine bereits ausreichend beschrieben (vgl. Stryer, "Biochemistry, 2. Auflage (1994), Seiten 311 und 359; Römpp, Chemielexikon, 10. Auflage (1997), Seiten 2382 bis 2384), kann jedoch auch (z.B. für neu entdeckte Lektine oder für modifizierte Lektine) mit bekannten Methoden analysiert werden. Dies gilt insbesondere für die jeweiligen Bindungsspezifitäten für bestimmte Kohlehydratstrukturen von ausgewählten Zielzellen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kommen auch bevorzugt solche Lektine zum Einsatz, die lang bekannt und gut beschrieben sind, wie z.B. Concanavalin A, Abrin, Ricin, Phasin oder WGA, da bei diesen Systemen auch Modifikationen ohne größeren Aufwand bewerkstelligt werden können. Derartige Modifikationen (z.B. bezüglich der Bindungsstelle zum Arzneimittel oder im Erkennungsbereich für die Kohlehydratstruktur der Zielzelle) können zwar auch bei weniger gut beschriebenen oder völlig neuen

den Fachmann bekannt

Erfindungsgemäß hat sich der Einsatz von WGA besonders bewährt, da dieses praktisch keinerlei perorale Toxizität aufweist und eine hohe Spezifität gegenüber malignen Zellen aufweist. Insbesondere aufgrund der hohen Spezifität gegenüber Colonkarzinom-Zellen ist es besonders bei der zielgerichteten Arzneimittelzufuhr in diese Zellen geeignet. Unter WGA werden erfindungsgemäß auch chemisch modifizierte WGA-Moleküle oder WGA-Derivate verstanden, die die wesentlichen Eigenschaften des (nativen) WGA aufweisen bzw. bei welchen die Bindungsspezifität gezielt und kontrolliert verändert worden ist.

Unter verabreichungsstabiler Verbindung wird erfindungsgemäß eine Verbindung verstanden, die eine ausreichende Stabilität des erfindungsgemäßen Präparats bei der Lagerung, bei der Verabreichung und beim Weg im Patienten zum Ziellocus gewährt. Wesentlich ist aber auch, daß diese Verbindung zwischen Lektin und Arzneistoff in der Zielzelle gespalten werden kann, oder der Arzneistoff auf andere Weise seine Wirkung entfalten kann. Demgemäß kommen beispielsweise eine säure- oder basenlabile Verbindung oder eine durch ein für die Zielzelle spezifisches Enzym, z.B. eine Protease oder Nuklease, spaltbare Verbindung zur Anwendung.

Die erfindungsgemäßen Präparate zeigen einen hohen antiproliferativen Effekt auf die Zielzellen, da das konjugierte Arzneimittel leicht und effektiv in die Zielzelle aufgenommen wird. Es kommt daher zu einer intrazellulären Akkumulation der erfindungsgemäßen Präparate. Im WGA-System ermöglicht die säurelabile cis-aconityl-Verbindung eine Freisetzung des Arzneimittels erst im lysosomalen Bereich der Zielzelle.

Als Arzneimittelkomponente zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist prinzipiell jedes Arzneimittel geeignet, das eine Bindung mit Lektinen eingehen kann. Diese Bindung kann auch, wenn sie mit den nativen Lektinen nicht möglich ist, durch Modifikation von bestimmten Bindungsstellen oder Aminosäure-Seitenketten ermöglicht werden. Auch können, ausgehend von bekannten Arzneimitteln, speziell für die vorliegende Erfindung geeignete abgeleitete Arzneimittel "designed" werden, die eine Bindung mit Lektinen eingehen

können. Aufgrund der abnormen Veränderung der Glykocalyx (die gewebsspezifische Polysaccharidschicht, die jede Eukaryonten-Zelle umgibt und aus membranständigen Glykoproteiden und Glykolipiden aufgebaut ist) die oft mit einer malignen Transformation verbunden ist, eignet sich das erfindungsgemäße Lektin-"Drug-Targeting" hervorragend zur Verabreichung von Zytostatika oder anderen Krebs-Behandlungsmitteln. Als Tumor-Behandlungsmittel kommen im Prinzip alle Mittel in Betracht, die bislang in konventioneller Therapie verwendet wurden, z.B. alkylierende oder quervernetzende Verbindungen, zytostatische Antibiotika, Antimetabolite, Mitosehemmstoffe oder Hormone und Hormon-Antagonisten. Beispiele für diese Substanzklassen schließen ein: Cyclophosphamid, Carmustin, Thiotepa, Busulfan, Cisplatin, Daunorubicin, Doxorubicin, Bleomycin, Mitomycin, Methotrexat, Mercaptopurin, Fluorouracil, Vinca-Alkaloide, Taxane, Formestan, Gestagene oder Antiandrogene. Ein bevorzugtes erfindungsgemäßes Präparat umfaßt daher WGA, an das ein Tumor-Behandlungsmittel gebunden ist.

Diese Substanzen, z.B. Doxorubicin (DOX), können vorteilhafterweise über eine säurelabile Bindung (z.B. die cis-Aconityl-Brücke an WGA) gebunden werden. Es zeigte sich, daß eine Zweischnitt-Kopplungsreaktion (siehe Beispiele) von DOX an WGA ein wasserlösliches Prodrug (DOX-WGA) mit einem Substitutionsgrad von 24 mol DOX/mol WGA erfolgt. Dieses Prodrug ist im neutralen Milieu stabil, bei pH 4,0 werden jedoch innerhalb von 24 Stunden  $46 \pm 7\%$  des WGA-gebundenen DOX freigesetzt. Damit wird das Zytostatikum erst im intralysosomalen, sauren Milieu verfügbar. Die DOX-WGA-Bindungskapazität von Colonkarzinom-Zellen ist zumindest 4,5mal höher als jene von humanen Colonozyten und lymphoblastischen MOLT-4-Zellen, eine Bindung an Erythrozyten ist nicht meßbar. Unter Berücksichtigung der Freisetzungsrates des Arzneistoffes aus dem Konjugat ist die zytostatische Wirkung des Arzneistoffes in Konjugatform auf Karzinomazellen zumindest 1,5mal höher als jene des freien Zytostatikums. Die antiproliferative Wirkung von DOX-WGA auf Lymphoblasten ist hingegen um 65% geringer als jene des freien Wirkstoffes. Im Gegensatz zum freien Wirkstoff wird aber durch die erfindungsgemäße zielgerichtete Zuführung eine enorme Verringerung der Nebenwirkungsrate ermöglicht, sei es durch die geringere Beeinträchtigung von Nicht-Zielzellen oder

sei es durch einen verringerten Einsatz des Zytostatikums (durch Dosisreduktion). Damit wird die Therapie des Tumors, z.B. die Therapie des Colonkarzinomes durch DOX-WGA, um vieles angenehmer.

Weitere bevorzugte Arzneimittel sind vor allem Arzneimittel auf Proteinbasis, da jene durch den Verbund mit den Lektinen zusätzlich zur zielgerichteten Verabreichung auch z.T. erheblich stabilisiert werden, was bei fragilen Proteinarzneimitteln sehr hilfreich sein kann. Bevorzugterweise können mit dem erfindungsgemäßen System durch die Kopplung an Lektine hochmolekulare Proteinarzneimittel, insbesondere Blutgerinnungsfaktoren oder andere aus Blut gewinnbare Proteine, wie Inhibitoren oder Cofaktoren, oder deren rekombinante Äquivalente gezielt verabreicht werden.

Da die meisten Lektine, insbesondere pflanzliche, wie WGA, gastrointestinal stabil sind, können daher die erfindungsgemäßen Präparate peroral verabreicht werden, wobei lediglich gegebenenfalls eine übliche magensaftresistente Hüllschicht vorgesehen werden kann, was zu einer weiteren Erleichterung der Therapie führt.

Das erfindungsgemäße System eignet sich auch hervorragend zur Verabreichung von Nukleinsäuren, beispielsweise zur Gentherapie oder für Antisense-Therapie. Hierbei kann die Nukleinsäure, z.B. cDNA, Antisense-RNA, ..., wie ein normales Arzneimittel an das Lektin gebunden werden. Bei WGA kann dies selbstverständlich auch über die säurelabile Bindungsstelle erfolgen.

Die erfindungsgemäßen Präparate werden bevorzugterweise in den üblichen und für die jeweilige Arzneimittelsubstanz günstigen Verabreichungsform zur Verfügung gestellt. Die Dosierung kann sich an der üblichen Dosierung für die Arzneimittelsubstanz orientieren, wobei, bedingt durch die effizientere Verabreichung, eine Dosisreduktion in Erwägung gezogen werden kann. Auch können die üblichen, bewährten Hilfssubstanzen für das Medikament verwendet werden, oft ist aber durch die erfindungsgemäße Formulierung eine verbesserte Wasserlöslichkeit (bedingt durch die Lektine) verbunden, womit z.B. Lösungsvermittler reduziert oder sogar weggelassen werden können. Auch kann sich durch die erhöhte Stabilität der



erfindungsgemäßen Präparate, die Verwendung großer Mengen an Stabilisatoren vermieden werden.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und den Zeichnungsfiguren, auf die sie jedoch nicht eingeschränkt sein soll, näher erläutert.

Beispiele:

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemicals**

Wheat germ agglutinin from *Triticum vulgare* and its fluorescein labelled analogue (molar ratio fluorescein/protein = 3.2) were purchased from Vector laboratories (Burlingame, U.S.A). Doxorubicin, cis-aconitic anhydride, N,N'-dicyclohexylcarbodiimide,  $\epsilon$ -amino-n-caproic acid and N-hydroxysuccinimide were obtained from Sigma (St.Louis, MO, U.S.A.); all other chemicals were of analytical grade and purchased from Merck (Darmstadt, G). Tissue culture reagents were from Biowhittaker (Workingham, U.K.), kits for XTT- (EZ4U) and BrdU-test were purchased from Biomedica (Vienna, Austria) and Boehringer Mannheim (Vienna, Austria), respectively.

### **Conjugation of doxorubicin to WGA**

N-cis-aconityl-doxorubicin was prepared according to Yang and Reisfeld (12) with modifications. All reactions were carried out under protection from light and monitored by TLC on KGF<sub>254</sub> using chloroform/methanol/water 9+9+1.8 or 8+10+2.5 (v/v/v) as the mobile phase. DOX (1.79 $\mu$ mol) was dissolved in 1.5ml methanol and was stirred with an etheric solution of cis-aconitic anhydride (5.2 $\mu$ mol) for 1h at room temperature. After evaporation to 500 $\mu$ l, the doxorubicin-cis-aconitate was activated by reacting with 7.2 $\mu$ mol N,N'-

dicyclohexylcarbodiimide and 7.2  $\mu$ mol N-hydroxysuccinimide. The reaction mixture was stirred for 2h at room temperature and overnight at 4°C. Dicyclohexylurea was precipitated by addition of 1ml 3% aqueous sodium bicarbonate solution and collected by centrifugation at 7500rpm for 5min. The residual methanol was removed from the supernatant by evaporation.

The doxorubicin-cis-aconitate-N-hydroxysuccinimide ester was conjugated to WGA by dropwise addition of a solution containing 0.033  $\mu$ mol WGA in 500  $\mu$ l 3% aqueous sodium bicarbonate pH 8.0. After incubation overnight at 4°C, the conjugate (DOX-WGA) was dialyzed against 20mM HEPES/NaOH-buffer pH 7.4 at 4°C until no free drug was detected by spectrophotometric examination of the dialysis medium at 468nm (detection limit: 2  $\mu$ g/ml DOX). Upon TLC DOX-WGA was the only fluorescent compound observed indicating no detectable free DOX.

#### **Estimation of the coupling rate**

The number of DOX molecules coupled per molecule of WGA was calculated from the absorption at 468nm relatively to WGA in 20mM HEPES-buffer pH 7.4 using DOX for calibration (U-3000 UV-VIS Spectrophotometer, Hitachi).

#### **Determination of amino-residues on WGA**

The total number of amino-groups of WGA susceptible to derivatization was determined by a modified trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS)/adipic acid dihydrazide (ADH) test (13). Briefly, 200  $\mu$ l of a solution containing 125-175  $\mu$ g WGA in 20mM HEPES pH 7.4 were mixed with 200  $\mu$ l 0.02% TNBS in saturated sodium tetraborate/distilled water (1+1, v/v) and incubated for 10min. at 70°C. After addition of 100  $\mu$ l 0.5M aqueous ADH-solution and gently vortexing, the absorbance of trinitrobenzene adipic acid dihydrazone was read at 520nm. The

number of amino-residues was calculated from a calibration curve using  $\epsilon$ -amino-n-caproic acid. The test allows quantification of 80-680nmol amino residues/ml.

### ***In vitro* release of conjugated doxorubicin**

*In vitro* release studies of DOX from the conjugate were performed at 37°C under protection from light. A small dialysis tubing (MW cut-off 12kDa) containing 250 $\mu$ l DOX-WGA corresponding to 7.5 $\mu$ g DOX was placed in a small screw tube filled with 1.5ml 0.1M phosphate/citrate-buffer pH4.0. To guarantee unimpeded diffusion of released DOX, air bubbles were carefully removed from the surface of the membrane. While stirring the dialysis medium, 500 $\mu$ l aliquots were withdrawn in regular intervals and returned immediately to the vessel after reading the absorbance at 468nm. The amount of DOX released from the conjugate was calculated from a calibration curve of DOX.

### **Cells and culture conditions**

The human colon carcinoma cell line Caco-2 and the human lymphoblastic cell line MOLT-4 were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, U.S.A.). Cells were grown in culture medium consisting of RPMI-1640 with 10% fetal calf serum, 4mM L-glutamine and 75 $\mu$ g/ml gentamycin in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95 % air atmosphere at 37°C and subcultured by trypsinisation.

Human colonocytes were obtained from normal tissue adjacent to resected colon carcinoma specimen. The tissue was dissociated by incubation in collagenase-solution (1000U/ml medium) at 37°C for about 1h till single cells were released as shown by light microscopy. Cells were repeatedly washed with PBS by centrifugation at 1300rpm for 5min. at 4°C. The pellet was resuspended in PBS and the preparation was analyzed using a Casy1 DT cell counter and analyser system (Schärfe, G). Thus the cell-preparation was composed of  $1 \times 10^6$

colonocytes/ml (diameter 7-10 $\mu$ m) and 17x10<sup>6</sup> cells/ml exhibiting diameters lower than 7 $\mu$ m, mainly red blood cells as observed by light microscopy.

### **Binding of DOX-WGA to human colonocytes, Caco-2 and MOLT-4 cells**

Using a 96-well microtiter plate, 50 $\mu$ l of cell-suspension (5x10<sup>4</sup> colonocytes or lymphoblasts) in PBS, 100 $\mu$ l 20mM HEPES pH7.4 and 50 $\mu$ l of a solution containing 3.6, 1.8 or 0.9 $\mu$ g DOX-WGA in HEPES were incubated for 1h, 2h or 12h at 4°C. Cells were spun down (1000rpm, 5min., 4°C) and 120 $\mu$ l of the supernatant were discarded. After addition of 120 $\mu$ l HEPES, the washing step was repeated in the same manner. Cells were resuspended in 1.8ml Cell Pack and assayed by flow cytometry.

Negative controls were included in each experiment consisting of unlabeled cells for estimation of autofluorescence. Each concentration was tested in quadruplicate and repeated at least twice.

### **Flow cytometry**

Flow cytometric measurements were carried out on an Epics XL-MC analytical flow cytometer (Coulter, FL, U.S.A). Labelled cells were analyzed using a forward versus side scatter gate for the inclusion of single cell populations and exclusion of debris and cell aggregates. Fluorescence was detected at 575nm (10nm bandwidth) and the mean channel number of the logarithmic fluorescence intensities of individual peaks was used for further calculations. Amplification of the fluorescence signals was adjusted to put the autofluorescence signal of unlabelled cells in the first decade of the 4-decade log range. For each measurement 5000 cells were accumulated.

### **Confocal microscopy**

Cells were stained by incubation of 100µl cell-suspension ( $2 \times 10^6$ /ml HEPES) with 100µl solution of DOX-WGA (69µg/ml HEPES) or fluorescein labelled WGA (100µg/ml HEPES) for 1h at 37°C. Cells were spun down (5min., 1000rpm), washed twice as described above but using 150µl HEPES and mounted for microscopy. Confocal images of fluorescent labelled cells were obtained using a Zeiss Axiovert confocal microscope. Transmission light and fluorescence pictures were acquired at 40x magnification and intracellular DOX as well as fluorescein were detected by excitation at 488nm and emission >515nm.

### **Cell proliferation assays**

Cell proliferation was determined by the XTT- and the BrdU-assay, which were performed following the manufacturers instructions using colourless supplemented RPMI 1640 medium for cell culture.

To estimate the influence of WGA and F-WGA on Caco-2 cell proliferation, 100µl cell suspension ( $2 \times 10^4$  cells) and 75µl of each of a dilution series of WGA and F-WGA (0, 0.06, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 1.5, 3, 6 and 30µg) were incubated under tissue culture conditions for 3d followed by addition of 20µl XTT-reagent solution. The absorbance of the formazan formed was determined at 450nm (Anthos ELISA Reader 2001) versus a negative control consisting of medium and XTT-reagent solution.

The cytotoxic activity of DOX-WGA was determined by the XTT-assay as described above, but using  $10^4$  MOLT-4- or Caco-2 cells/100µl RPMI 1640 medium and 75µl of each of a solution containing DOX (0.15 or 0.10µg), WGA (0.45 or 0.32µg) or DOX-WGA (0.57 or 0.41µg), respectively.

Moreover, cell proliferation of Caco-2 cells pretreated with DOX-WGA was investigated using a colorimetric immunoassay, the BrdU-test. 75µl of each of a solution containing WGA

(0.6, 0.43, 0.30 $\mu$ g), DOX (0.15, 0.11, 0.075 $\mu$ g) or DOX-WGA (0.57, 0.41, 0.285 $\mu$ g) in HEPES were added to the well of a microtiter plate containing 100 $\mu$ l cell suspension ( $5 \times 10^3$  Caco-2 cells). After incubation under tissue culture conditions for 96h 20 $\mu$ l BrdU-labelling solution were added followed by another 14h incubation. The supernatant was discarded and upon addition of 200 $\mu$ l FixDenat-solution the cells were fixed and the DNA was denatured. The supernatant was removed 30min. later and 100 $\mu$ l of BrdU-antibody-peroxidase was added. After 90min. of incubation, cells were washed three times with 200 $\mu$ l washing buffer and 100 $\mu$ l substrate were added. After 10min. the enzyme activity was stopped by addition of 25 $\mu$ l 1M sulfuric acid and the absorbance was measured at 450nm versus the blank prepared as above but omitting the cells.

All assays were performed in quadruplicate and repeated at least twice. Additionally, positive controls were included in each experiment by omission the substances under investigation.

## RESULTS

### Preparation and characterization of cis-aconityl-linked doxorubicin-WGA (DOX-WGA)

To use WGA as a carrier protein for targeted prodrug delivery of DOX, the cytostatic agent was linked covalently to the protein by a two step procedure. First, the drug was converted quantitatively to the corresponding carboxylic-acid derivative by reacting the free amino-residue of daunosamine with cis-aconitic anhydride ( $R_{f_{product}} = 0.21$ ,  $R_{f_{DOX}} = 0.14$ ; chloroform/methanol/water, 9+9+1.8 (v/v/v). In contrast to the literature (12), the reaction yielded N-cis aconityl DOX only in anhydrous medium. Despite of formation of both, the  $\alpha$ - and the  $\beta$ -monoamide isomer only one spot was observed upon TLC.

To avoid cross-linking of WGA by preactivation of the protein, the N-cis-aconitate-DOX was reacted with dicyclohexylcarbodiimide/N-hydroxysuccinimide to form an active ester intermediate prior to coupling (14). As indicated by TLC ( chloroform /methanol/water

8+10+2.5 (v/v/v), the N-cis-aconityl-derivative ( $R_f = 0.24$ ) was converted to the corresponding N-hydroxysuccinimide ester ( $R_f = 0.88$ ) to an extent of about 75%. Involving the active ester of either the  $\beta$ - or  $\gamma$ -carboxyl-residue of cis-aconitate-doxorubicin, the drug was conjugated to accessible amino-residues of WGA forming an amide-bond. UV-difference spectroscopy of the purified conjugate confirmed covalent attachment of DOX to the carrier protein resulting in a conjugation number of about 24 moles DOX/mol WGA. As WGA represents a mixture of isolectins containing  $24 \pm 1.53$  amino groups (mean  $\pm$  SD,  $n=6$ ) as determined by the TNBS/ADH-test, the coupling reaction yielded densely coated lectin, but still being freely water-soluble.

As the cis-aconityl spacer was reported to be a pH-sensitive linkage (15) for intralysosomal release of the conjugated drug, the *in vitro* release profile of conjugated DOX at pH4.0 was determined spectrophotometrically using a dialysis tubing for exclusion of the conjugate. Within 24h of incubation at pH4.0,  $46 \pm 7\%$  of conjugated DOX were released from WGA; but upon prolonged incubation, the release rate was not increased markedly, since exposure of DOX-WGA to acidic milieu for 168h resulted in release of  $51 \pm 6\%$  conjugated DOX. As indicated by the release profile, half of the available drug was released after 65min. (Figure 1).

#### **Binding of DOX-WGA to Caco-2 cells, human colonocytes and lymphoblasts**

In order to estimate the conjugate-binding capacity of target- and non-target cells, increasing amounts of DOX-WGA were allowed to interact with a fixed number of cells of different origin and assayed by flow cytometry. This technique allows quantification of cell-bound fluorescence intensity only (16). Caco-2 cells were used as a representative for malignant transformed cells, whereas human colonocytes and the human lymphoblastic MOLT-4 cells

were included as a model for unaffected - and stem cells, respectively.

In comparison to the autofluorescence of the cells ( $0.6 \pm 0.1$ ), the mean cell-bound fluorescence intensity of Caco-2 cells increased markedly upon addition of DOX-WGA yielding  $11.8 \pm 0.7$  -  $37.9 \pm 0.1$  relative fluorescence intensity concurrent with increasing concentration of the conjugate. In contrast, binding of increasing amounts of DOX-WGA to non-target cells resulted in rather low and slightly increasing cell-bound fluorescence intensity ranging from  $2.4 \pm 0.05$  to  $8.5 \pm 1.0$  (human colonocytes) and  $2.5 \pm 0.07$  to  $9.3 \pm 0.1$  (MOLT-4), respectively. As the mean cell-bound fluorescence intensity increased upon addition of increasing amounts of DOX-WGA, binding to the cell lines under investigation might be attributed to a specific interaction (Figure 2).

Since the preparation of human colonocytes contained 94% cells of different kind, mainly erythrocytes, conjugate-binding was investigated by adjusting the forward versus side scatter gate to record the cell population  $< 7 \mu\text{m}$  exclusively. As the mean relative fluorescence intensity of 0.3 covered the range of the autofluorescence of these cells, DOX-WGA-binding to erythrocytes might be neglected.

In general, the DOX-WGA-binding capacity of Caco-2 cells was  $4.6 \pm 0.3$  fold higher than that of human colonocytes. The amount of DOX-WGA bound to MOLT-4 cells was in the same order of magnitude like that of human colonocytes being only  $10 \pm 3\%$  higher.

Not only binding to the Caco-2 membrane, but also internalization of DOX-WGA was observed by confocal laser scanning microscopy of viable Caco-2 cells preincubated with the conjugate (Figure 3). After 1h of incubation at  $37^\circ\text{C}$ , the fluorescent DOX-WGA-conjugate accumulated near the nuclear membrane of the dividing Caco-2 cell. In contrast, when Caco-2 cells were stained with fluorescein labelled WGA under the same conditions, the lectin was distributed over the cytoplasm with some intensely stained granular regions indicative for



vesicular accumulation. Thus, cell-binding of the conjugate is followed by uptake of the prodrug, but the intracellular distribution pattern being dependent on the substance used for conjugation.

### **Antiproliferative effects von DOX-WGA on tumor cells and lymphoblasts**

The effect of WGA, F-WGA, DOX and DOX-WGA on tumor cell growth was investigated by the XTT-test. In this assay, the tetrazolium salt XTT is metabolically reduced by viable cells yielding the soluble, highly coloured formazan indicative for cell proliferation.

Although WGA inhibited proliferation of Caco-2 cells in a dose-dependent manner exhibiting 50% inhibition of cell growth ( $IC_{50}$ ) at  $530 \pm 40$  ng WGA/ $2 \times 10^4$  Caco-2 cells as calculated from a sigmoidal plot according to Boltzman, WGA-concentrations  $< 60$  ng/well not markedly influenced cell growth (Figure 4). In contrast, labelling of WGA using fluorescein isothiocyanate altered the inhibitory activity of the lectin resulting in the  $IC_{50} = 623 \pm 84$  ng F-WGA/ $2 \times 10^4$  Caco-2 cells. Moreover, upon addition of lower amounts than 54 ng F-WGA, the labelled lectin stimulated proliferation of Caco-2 cells.

Considering the influence of the unmodified carrier protein on the inhibitory activity of DOX-WGA, the concentrations of WGA and DOX applied to the XTT-test were equivalent to the conjugate in order to provide comparability of the data obtained. Whereas WGA inhibited Caco-2 cell growth to an extent of  $40.3 \pm 14.6\%$  (at 450 ng WGA/ $10^4$  cells) and  $6.7 \pm 3.3\%$  (at 320 ng WGA/ $10^4$  cells), the cytostatic activity of DOX-WGA on Caco-2 cells increased concurrent with decreasing WGA-concentrations by  $14.3 \pm 8.3\%$  and  $34.0 \pm 6.1\%$ , respectively (Figure 5A). On the other hand, equivalent amounts of DOX-WGA yielded 63% or 46% of the antiproliferative effect of DOX.

Compared to Caco-2 cells, equal amounts of the substances under investigation exerted less



influence on the viability of lymphoblastic MOLT-4 cells (Figure 5B). Whereas DOX inhibited cell growth to an extent of about  $13 \pm 5.2\%$ , the inhibitory activity of DOX-WGA on MOLT-4 cells was  $9.4 \pm 3.2\%$  (at  $450 \text{ ng}/10^4$  cells) and  $5.0 \pm 2.6\%$  (at  $320 \text{ ng}/10^4$  cells), respectively.

In contrast to the XTT-test, the influence of carrier protein alone on Caco-2 cell proliferation was quite different as determined by quantification of the DNA content by the BrdU-test. As the concentration of the carrier protein decreased from 600 to 300 ng WGA/5000 cells, initially no considerable inhibitory effect ( $4.6 \pm 12.3\%$ ) was observed, but this effect was converted to increasing stimulation of Caco-2 cell-growth (Figure 6). On the other hand, in comparison to DOX-WGA equivalent amounts of the free drug exhibited high cytostatic activity resulting in a growth inhibition of  $95.2 \pm 2.1\%$  on average. Upon preincubation of Caco-2 cells with DOX-WGA, the antiproliferative activity of equivalent amounts of DOX decreased by  $20 \pm 5.6\%$ .

## DISCUSSION

In order to derive advantage from the quite different WGA-binding capacity of Caco-2 cells and human colonocytes for targeting drugs to colon carcinoma cells *in vitro* (11), DOX was covalently coupled to WGA via an acid-sensitive cis-aconitic linkage by a two-step mechanism (12). Since WGA represents a mixture of four isolectins (17), for estimation of the coupling efficiency the number of amino-residues on WGA was determined to be  $24 \pm 1.4$  by combining the TNBS-test with ADH. Coupling was confirmed qualitatively and quantitatively by UV/VIS-difference spectroscopy and yielded a conjugate free of detectable non-covalently linked drug containing 24 moles DOX/mol WGA. Despite derivatization of nearly all accessible amino-residues of WGA, water solubility of DOX-WGA was retained.

In accordance with the literature(15), the cis-aconityl linkage between the drug and WGA was pH-sensitive being stable at pH7.0 and exhibited a half life of 1h at pH4.0. But only 50 % of the drug content were released from DOX-WGA within 168h as opposed to almost 100% release of antibody-conjugated daunomycin at pH3.0 (14). In our work N-cis-aconityl-doxorubicin was activated in aprotic milieu probably yielding equal amounts of the N-hydroxy-succinimide ester of both, the  $\beta$ - and the  $\gamma$ -carboxyl. Since one free cis-carboxylic function is a prerequisite for pH-sensitivity of the linkage (15), the release of only half of the DOX conjugated might be attributed to formation of an amide bond between WGA and the  $\beta$ -carboxyl of the  $\alpha$ -monoamide isomer of N-cis-aconityl-doxorubicin.

As confirmed by confocal laser scanning microscopy of F-WGA and DOX-WGA, the N-acetylglucosamine specific lectin retained its bioadhesive and cytotoxic properties upon conjugation of the cytostatic agent. Due to acid-sensitivity of the linkage, intralysosomal release of conjugated DOX is expected when DOX-WGA reaches the acidic milieu of the lysosomal compartment. As a consequence of derivatisation, the intracellular distribution pattern of WGA was altered resulting in accumulation of DOX-WGA near the nuclear membrane of Caco-2 cells.

Binding-specificity of the conjugate was assessed by flow cytometric determination of cell-bound fluorescence intensity derived from DOX-WGA. Independent from time of exposure, DOX-WGA exhibited dose-dependent binding to target- and non-target cells, but the extent being quite different. On average, the binding capacity of the colon carcinoma cells Caco-2 exceeded that of human colonocytes and lymphoblastic MOLT-4 cells 4.5fold. Additionally binding of DOX-WGA to human erythrocytes was not detected. These results indicate for high target specificity of the conjugate. Considering the high extent of coupling, the decreasing ratio of binding to Caco-2 cells versus human colonocytes from 13:1 (F-WGA, 11) to 4:1 (DOX-WGA) might be related to densely derivatization of the lectin by the

hydrophobic anticancer drug as observed for immunoconjugates (18).

When the effects of WGA and F-WGA on mitosis were investigated by determination of the mitochondrial dehydrogenase activity, in accordance with Ryder et al. (19) reversing effects on Caco-2 cell growth were observed: at comparable concentrations, the native lectin exhibited dose-dependent inhibition of Caco-2 cell growth, but upon conjugation of fluorescein this inhibitory effect converted to stimulation at concentrations  $<54\text{ ng F-WGA}/2 \times 10^4$  cells. As observed by Kawamoto et al. (20), epidermal growth factor (EGF) inhibited proliferation of A431 epidermoid carcinoma cells in the nM-range, but had a mitogenic effect in the pM-range. As the tyrosine kinase activity of EGF-receptor was activated by WGA to a similar extent as the enhancement induced by epidermal growth factor (21), this effect might be due to EGF-receptor binding of WGA.

However contribution of the carrier protein of DOX-WGA to the antiproliferative effect of the conjugate on Caco-2 cells was rather low, since the inhibitory activity of equivalent amounts of WGA and DOX-WGA was  $6.7 \pm 3.3\%$  and  $39 \pm 6.1\%$ , respectively. Thus the cytostatic activity of DOX-WGA mainly derives from the conjugated drug yielding about 60% of the cytostatic activity of free DOX. When the XTT-assay was performed with lymphoblastic MOLT-4 cells as a model for non-target cells, cell growth was inhibited by DOX-WGA in a dose dependent manner to an extent of 35% at the best as compared to free DOX (100%). This decreasing antiproliferative activity on non-target cells of equivalent amounts of DOX might be attributed to targeted delivery of the anticancer agent upon conjugation to WGA.

Since unaffected growth of Caco-2 cells preincubated with equivalent amounts of the carrier protein is required for clear estimation of the antiproliferative activity of DOX-WGA, BrdU-incorporation during DNA-synthesis was determined corresponding to the number of dividing cells. At equivalent concentrations of WGA and DOX as compared to DOX-WGA, the carrier

protein alone inhibited slightly or stimulated Caco-2 cell growth and the free drug exhibited 95% growth inhibition on average. The antiproliferative effect of conjugated DOX was 78% at the mean. Considering only 50% release of bound DOX *in vitro*, the cytostatic effect of DOX-WGA might be equal or quite higher than that of the free drug due to site-specific efficacy of conjugated DOX.

## REFERENCES

1. R. Duncan, T. A. Connors, and H. Meada. Drug targeting in cancer therapy: the magic bullet, what next? *J. Drug Targeting* 3:317-319 (1996).
2. G. R. Thrush, I. R. Lark, B. C. Clinchy, and E. S. Vitella. Immunotoxins: an update. *Ann. Rev. Immunol.* 14:49-71 (1996).
3. F. Gabor, I. Haberl, M. Wirth, K. Richter, G. Theyer, G. Baumgartner, H. Wenzl, and G. Hamilton. In vitro antitumor activity of MIC2 protein-doxorubicin conjugates. *Int. J. Onc.* 9:527-531 (1996).
4. S. S. Davis and L. Illum. Colloidal carriers and drug targeting. *Acta Pharm. Technol.* 32:4-9 (1986).
5. J. Kreuter. Nanoparticulate systems in drug delivery and targeting. *J. Drug Targeting*. 3:171-173 (1995).
6. N. Sharon and H. Lis. Lectins: cell agglutination and sugar specific proteins. *Science* 177:949-959 (1972).
7. C. M. Lehr in Lectins—Biomedical Perspectives. A. Pusztai and S. Bardocz. (eds.) Taylor & Francis Ltd., London 1995.
8. A. Shanghal and S. Hakamori. Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *Diseases* 12:223-230 (1990).
9. I. E. Licner, N. Sharon, and I. E. Goldstein. The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine. Academic Press. Orlando, Florida, 1986.
10. A. Pusztai, S. W. B. Ewen, G. Grant, D. S. Brown, J. C. Stewart, W. J. Peumans, E. J. M. van Damme, and S. Bardocz. Antinutritive effects of wheat-germ agglutinin and other N-acetylglucosamine-specific lectins. *Br. J. Nutr.* 70:313-321 (1993).
11. F. Gabor, M. Wirth, G. Walcher, and G. Hamilton. Lectin-mediated Bioadhesion: Gastrointestinal Stability and Binding characteristics of Wheat Germ Agglutinin and *Solanum Tuberosum* Lectin on Caco-2, HT-29 and Human Colonocytes. *J. Contr. Rel.* 49:27-37 (1997).
12. H. S. Yang and R. A. Reisfeld. Doxorubicin conjugated with a monoclonal antibody directed to a human melanoma-associated proteoglycan suppresses the growth of established tumor xenografts in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1189-1193 (1988).
13. M. Wilchek, T. Miron, and J. Kohn. Affinity chromatography. *Methods Enzymol.* 104:3-55 (1984).
14. R. O. Dillman, D. E. Johnson, D. L. Shawler, and J. A. Koziol. Superiority of an acid-labile daunorubicin-monoclonal antibody immunoconjugate compared to free drug. *Cancer Res.* 48:6079-6102 (1988).
15. W. C. Shen and H. J.-P. Ryser. Cis-aconityl spacer between daunorubicin and macromolecular carriers: a model of pH-sensitive linkage releasing drug from a lysosomotropic conjugate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 102:1048-1054 (1981).
16. M. Ramanathan. Flow cytometry applications in pharmacodynamics and drug delivery. *Pharm. Res.* 14:1106-1114 (1997).
17. K. A. Kronis and J. P. Carver. Specificity of isolectins of wheat germ agglutinin for sialyloligosaccharides: a 360-Mhz proton nuclear magnetic resonance binding study. *Biochemistry* 21:3050-3057 (1982).
18. Z. Brich, S. Ravel, T. Kissel, J. Fritsch, and A. Schoffmann. Preparation and characterization of a water soluble dextran immunoconjugate of doxorubicin and the monoclonal antibody (ABL364). *J. Contr. Rel.* 19:245-258 (1992).
19. S. D. Ryder, J. A. Smith, E. G. Rhodes, N. Parker, and J. M. Rhodes. Proliferative responses of HT-29 and Caco-2 human colorectal cancer cells to a panel of lectins. *Gastroenterology* 106:85-93 (1994).
20. T. Kawamoto, J. D. Sato, A. Lo, J. Polikoff, G. H. Sato, and J. Mendelsohn. Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: Identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1337-1341 (1983).
21. F. Y. Zeng, A. Bengurfa, S. Kafert, S. André, H. J. Gabius, and A. Villalobo. Differential response of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity to several plant and mammalian lectins. *Mol. Cell Biochem.* 142:117-124 (1995).
22. W. Yin and P. W. Cheng. Lectin conjugate-directed gene transfer to airway epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 205:826-833 (1994).

017520

## Patentansprüche

- 1.: Pharmazeutisches Präparat, umfassend ein Lektin, an das ein Arzneimittel verabreichungsstabil gebunden ist.
- 2.: Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin ein pflanzliches Lektin ist.
- 3.: Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin ausgewählt ist aus Concanavalin A, Abrin, Ricin, Phasin oder WGA, insbesondere WGA.
- 4.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel ein Krebs-Behandlungsmittel ist.
- 5.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel DOX ist.
- 6.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel ein Protein ist.
- 7.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel ein aus Blut gewinnbares Protein oder dessen rekombinantes Äquivalent, insbesondere ein Blutgerinnungsfaktor, ist.
- 8.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die verabreichungsstabile Bindung zwischen Lektin und Arzneimittel eine säurelabile, kovalente Bindung ist.
- 9.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die verabreichungsstabile Bindung zwischen Lektin und Arzneimittel durch eine Protease, die spezifisch für die Zielzelle ist, gespalten wird.
- 10.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin ein modifiziertes Lektin ist.

017508

- 11.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin ein an seiner Bindungsstelle zum Arzneimittel modifiziertes Lektin ist.
- 12.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin ein an seiner Bindungsstelle zur Zielzelle modifiziertes Lektin ist.
- 13.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es zur peroralen Verabreichung konfektioniert ist und gegebenenfalls eine magensaftresistente Hüllschicht aufweist.
- 14.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin WGA ist und das Arzneimittel über die säurelabile cis-aconityl-Bindung verbunden ist.
- 15.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß es als Prodrug-Formulierung vorliegt.
- 16.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel eine Nukleinsäure umfaßt.
- 17.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel eine cDNA umfaßt.
- 18.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel eine Antisense-Nukleinsäure umfaßt.
- 19.: Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß es als Gentherapie-Formulierung vorliegt.

017528

Zusammenfassung:

Beschrieben wird ein pharmazeutisches Präparat, umfassend ein Lektin, an das ein Arzneimittel verabreichungsstabil gebunden ist.



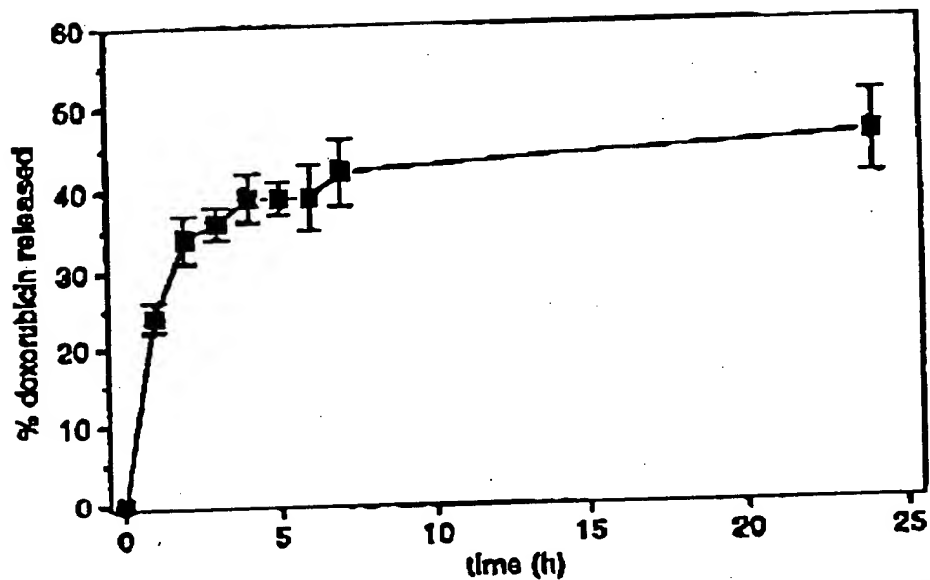


Fig. 1. In vitro release profile of DOX from DOX-WGA in 0.1M citrate/phosphate buffer pH 4.0 at 37°C (n = 3, mean  $\pm$  S.D.).

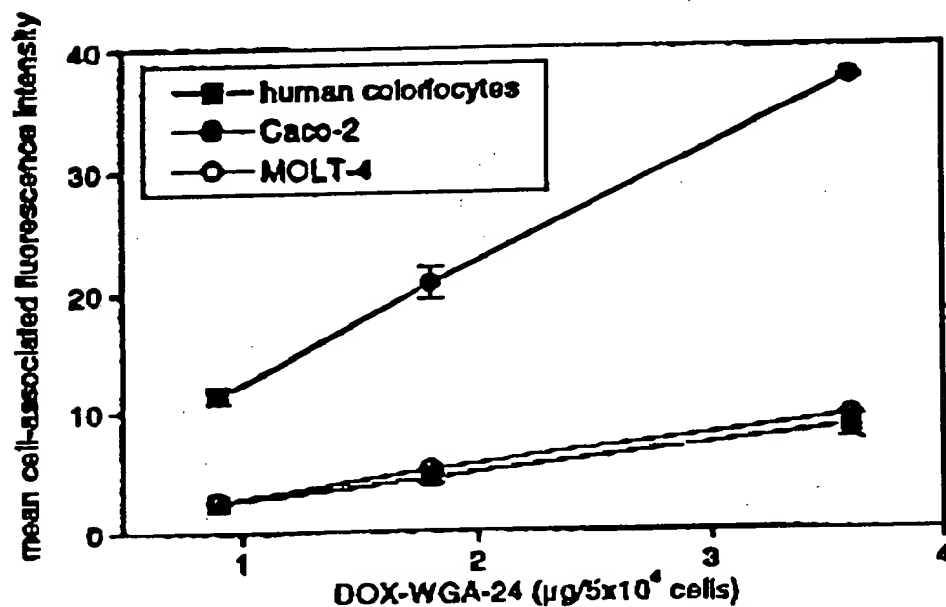


Fig. 2. Cell-bound fluorescence intensity of DOX-WGA incubated with human colonocytes, MOLT-4 and Caco-2 cells for 2h at 4°C after subtraction of the autofluorescence of cells (n = 8, mean  $\pm$  S.D.).

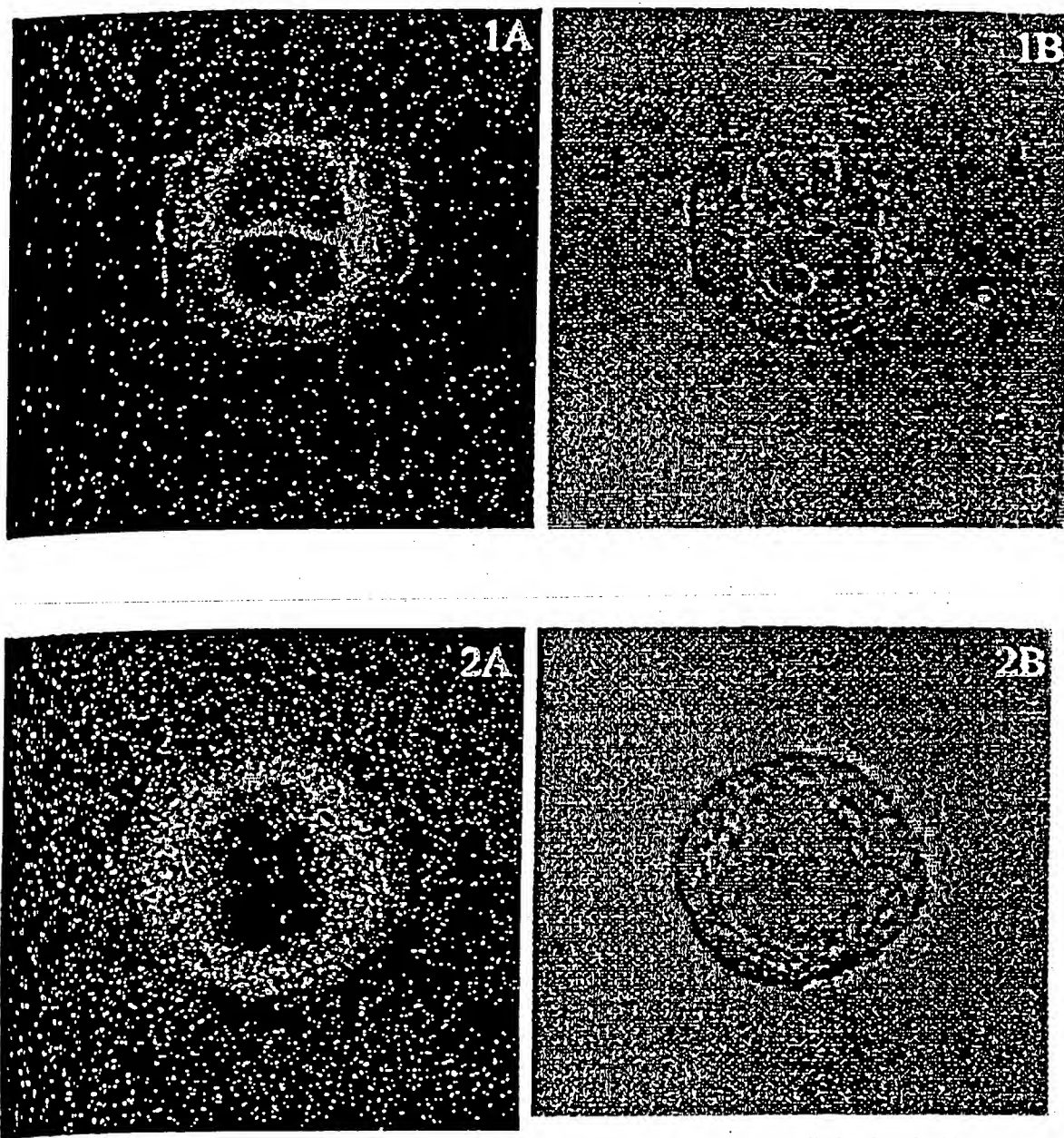


Fig. 3. Confocal fluorescence (A) and transmission light (B) microscopic images of Caco-2 cells incubated with DOX-WGA (1A) and fluorescein labelled WGA (2A). The cell diameter refers to about 20  $\mu\text{m}$ .

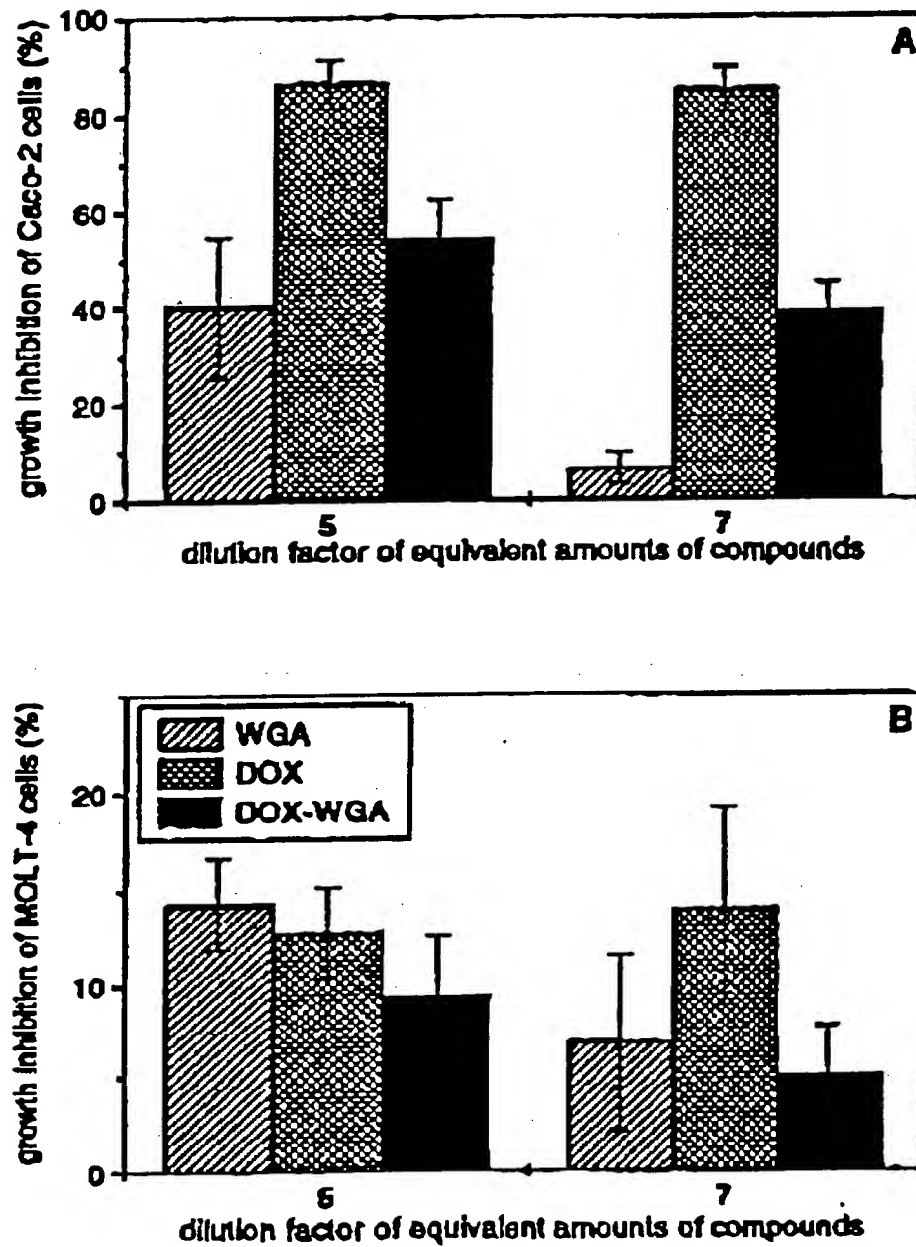


Fig. 5. Antiproliferative effects of WGA, DOX-WGA and DOX at equivalent concentrations on Caco-2 (A) and MOLT 4 cells (B) as determined by the XTT-test ( $n = 8$ , mean  $\pm$  S.D.).

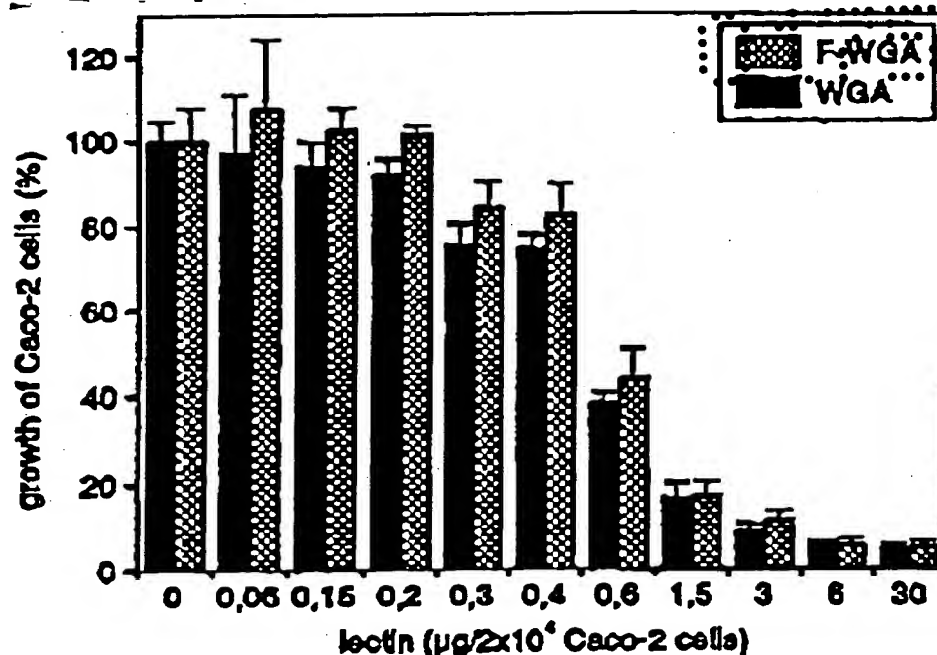


Fig. 4. Effect of F-WGA and WGA on Caco-2 cell growth as determined by the XTT-test ( $n = 8$ , mean  $\pm$  S.D.).

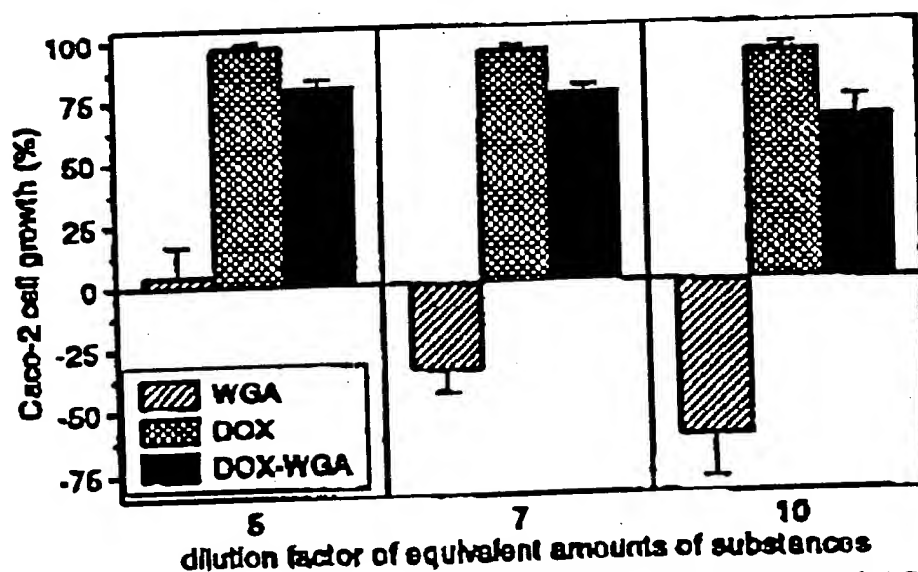


Fig. 6. Effect of equivalent amounts of WGA, DOX-WGA and DOX on Caco-2 cell growth as determined by the BrdU-assay ( $n = 8$ , mean  $\pm$  S.D.).